

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年2月7日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/10727 A1

(51) 国際特許分類: G01N 21/64

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05445

(22) 国際出願日: 2001年6月26日 (26.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-226758 2000年7月27日 (27.07.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 根本知己

(NEMOTO, Tomomi) [JP/JP]; 〒444-0876 愛知県岡崎市竜美北一丁目4番地14号 ベルハイツ竜美ヶ丘205号室 Aichi (JP). 河西春郎 (KASAI, Haruo) [JP/JP]; 〒444-0874 愛知県岡崎市竜美南二丁目2番1号 竜美ヶ丘公務員宿舎7号棟33号室 Aichi (JP).

(74) 代理人: 弁理士 清水 守 (SHIMIZU, Mamoru); 〒101-0053 東京都千代田区神田美土代町7番地10 大園ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): CA, US.

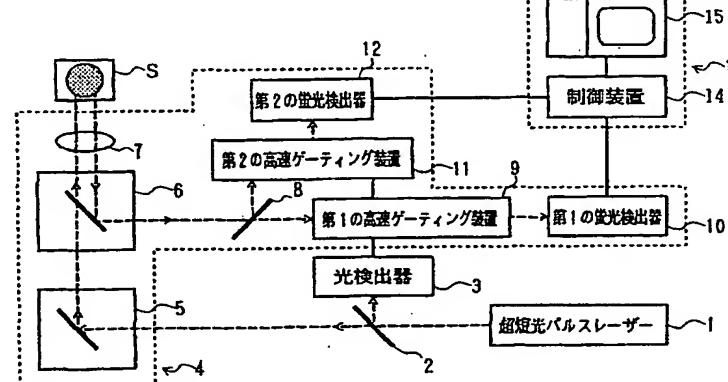
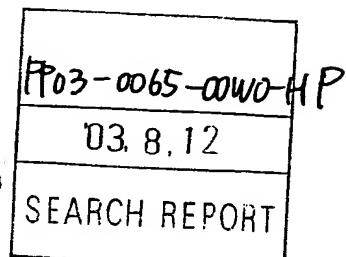
(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: MULTIPHOTON PUMPED FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING SYSTEM

(54) 発明の名称: 多光子励起蛍光寿命画像化システム



12...SECOND FLUORESCENCE DETECTOR  
11...SECOND HIGH SPEED GATING UNIT  
9...FIRST HIGH SPEED GATING UNIT  
3...PHOTODETECTOR  
14...CONTROLLER  
10...FIRST FLUORESCENCE DETECTOR  
1...ULTRASHORT LIGHT PULSE LASER

WO 02/10727 A1

(57) Abstract: A multiphoton pumped fluorescence lifetime imaging system in which inexpensive and easy-to-use deep part tomography lifetime imaging is realized through a combination of an ultrashort pulse laser, a laser scan fluorescence microscope, and high speed gating units. The multiphoton pumped fluorescence lifetime imaging system comprises an ultrashort light pulse laser generator (1), a laser scan fluorescence microscope (4), and high speed gating units (9, 11) disposed in front of the fluorescence detectors (10, 12) of the laser scan fluorescence microscope (4) wherein the ultra high speed shutters of the high speed gating units (9, 11) are pressed in synchronism with a pumping optical pulse from the ultrashort light pulse laser generator (1) and fluorescence is subjected to time resolution before being introduced to the fluorescence detectors (10, 12).

[続葉有]



---

(57) 要約:

超短光パルスレーザーと、レーザースキャン型蛍光顕微鏡と、高速ゲーティング装置とを組み合わせることにより、安価でかつ容易に使用できる深部断層蛍光寿命画像化を実現する多光子励起蛍光寿命画像化システムを提供する。

多光子励起蛍光寿命画像化システムにおいて、極短光パルスレーザー発生装置(1)と、レーザースキャン型蛍光顕微鏡(4)と、このレーザースキャン型蛍光顕微鏡(4)の蛍光検出器(10, 12)の前に配置される高速ゲーティング装置(9, 11)とを備え、前記極短光パルスレーザー発生装置1からの励起用光パルスと同期して前記高速ゲーティング装置(9, 11)の超高速シャッターを切るようにし、蛍光を時間分解を行ってから前記蛍光検出器(10, 12)に導入する。

## 明 細 書

## 多光子励起蛍光寿命画像化システム

## 技術分野

本発明は、生体組織等の深部断層多光子励起蛍光寿命画像化システムに関するものである。

## 背景技術

第1図はかかる従来の多光子顕微鏡システムの構成図である。

この図において、101は光パルスレーザー、102は光レーザースキャン型の蛍光顕微鏡であり、スキャンニング・ミラー103、レーザースキャン装置104、対物レンズ105、ハーフミラー106、ハーフミラー106を透過する蛍光を検出する第1の蛍光検出器107、ハーフミラー106で反射する蛍光を検出する第2の蛍光検出器108を有する。109は第1の蛍光検出器107と第2の蛍光検出器108からの出力信号を取り込む制御装置、110は制御装置に接続され、データを処理するコンピュータ、Sは試料である。

上記した多光子顕微鏡は、光パルスレーザー101と光レーザースキャン型の蛍光顕微鏡102からなり、生体組織等標本深部の断層像を高い分解能で取得できるという特徴を持っている。

第2図はかかる従来の蛍光寿命イメージングシステムの構成図である。

この図において、201はパルス化した励起光源、202はハーフミラー、203は顕微鏡であり、スキャンニング・ミラー204、レーザースキャン装置205を有している。また、206は対物レンズ、Sは試料、207はハーフミラー202から反射した光を検出する光検出器、208は高速ゲーティング装置であり、高速ゲーティング装置208からの出力信号は、CCDカメラ210、情報処理部211とディスプレイ212からなるカメラ付きデジタル情報処理装置209で蛍光寿命の可視化が試みられている。

このように、普通の蛍光顕微鏡で蛍光寿命の可視化は試みられているが、空間

分解能は高くなかった。

第3図はかかる従来の多光子励起寿命断層イメージングシステムの構成図である。

この図において、301は超短光パルスレーザー、302は超短光レーザースキャン型の蛍光顕微鏡であり、スキャンニング・ミラー303、レーザースキャン装置304、対物レンズ305、スキャンニング・ミラー303から反射される蛍光を検出する蛍光検出器306を有している。この蛍光検出器306の出力信号は、外部電子装置である特殊な蛍光時間分解計数装置308、情報処理装置309及びディスプレイ310からなる特別な処理専用の電子計算機307に入力され、情報が処理され、表示される。なお、Sは試料である。

このように、多光子励起寿命断層イメージングシステムによれば、多光子励起の蛍光寿命画像化も試みられているものの、蛍光検出後に大がかりな外部電子装置を用いて時間分解をしており、画像解析の際にも特別に処理専用の電子計算機が必要であった。

#### 発明の開示

上記したように、従来の蛍光顕微鏡は、種々の問題を有しており、技術的に満足のいくものではなかった。

本発明は、上記状況に鑑みて、超短光パルスレーザーと、レーザースキャン型蛍光顕微鏡と、高速ゲーティング装置とを組み合わせることにより、安価でかつ容易に使用できる深部断層蛍光寿命画像化を実現する多光子励起蛍光寿命画像化システムを提供することを目的とする。

本発明は、上記目的を達成するために、

(1) 多光子励起蛍光寿命画像化システムにおいて、超短光パルスレーザー発生装置(1)と、レーザースキャン型蛍光顕微鏡(4)と、このレーザースキャン型蛍光顕微鏡(4)の蛍光検出器(10, 12)の前に配置される高速ゲーティング装置(9, 11)とを備え、前記超短光パルスレーザー発生装置(1)からの励起用光パルスと同期して前記高速ゲーティング装置(9, 11)の超高速シャッターを切るようにし、蛍光を時間分解を行ってから前記蛍光検出器(10,

12)に導入するようにしたことを特徴とする。

(2)上記(1)記載の多光子励起蛍光寿命画像化システムにおいて、前記超短光パルスはピコ乃至フェムト秒パルスであることを特徴とする。

本発明によれば、蛍光顕微鏡装置の光検出器の前に高速ゲーティング装置を設置することにより、励起用光パルスと同期して超高速シャッターを切るようにし、蛍光を時間分解を行ってから蛍光検出器に導入するようにした。

本発明は、既存の多光子蛍光寿命イメージング手法と比べると、既存の装置やソフトウェアが流用できるので、必要となる時間、コストの面でも著しく改善される上に、操作性、利便性も改善される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、従来の多光子顕微鏡システムの構成図である。

第2図は、従来の蛍光寿命イメージングシステムの構成図である。

第3図は、従来の多光子励起寿命断層イメージングシステムの構成図である。

第4図は、本発明の実施例を示す多光子励起蛍光寿命画像化システムの構成図である。

第5図は、本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムによる蛍光寿命の測定例を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を図面を参照しながら詳細に説明する。

第4図は本発明の実施例を示す多光子励起蛍光寿命画像化システムの構成図である。

この図において、1は超短光パルス(ピコ乃至フェムト秒(p s乃至f s)パルス)レーザー、2は第1のハーフミラー、3は励起光パルスの光検出器、4は超短光レーザースキャン型の蛍光顕微鏡であり、スキャンニング・ミラー5、レーザースキャン装置6、対物レンズ7、第2のハーフミラー8、第1の高速ゲーティング装置9、第1の蛍光検出器10、第2の高速ゲーティング装置11、第2の蛍光検出器12、制御装置14とディスプレイ15からなるパーソナルコン

ピュータ13を備えている。なお、Sは試料である。

この実施例によれば、蛍光顕微鏡4の第1、第2の蛍光検出器10、12の前に第1、第2の高速ゲーティング装置9、11を設置することにより、励起用光パルスと同期して超高速シャッターを切るようにし、蛍光を時間分解を行ってから第1、第2の蛍光検出器10、12に導入するようにした。すなわち、励起光のフェムト秒パルスの光検出器3からの出力電圧をゲートトリガーの基準信号とした。これにより、試料S中の蛍光分子が励起される時刻から、ある遅延と幅でゲートされた蛍光成分を蛍光検出器に導入することができるようになった。

本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムは、既存の多光子蛍光寿命イメージングシステムと比べると、既存の装置やソフトウェアが流用できるので、必要となる時間、コストの面でも著しく改善される上に、操作性、利便性も改善される。

本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムを用いて測定された蛍光寿命の例を表1に示す。

| 蛍光寿命<br>(n s) | YG蛍光ビーズ<br>(Poly Sicence) | フルオレセイン<br>1 mM | スルフォローダミン<br>10 $\mu$ M |
|---------------|---------------------------|-----------------|-------------------------|
| 実測値           | 2. 4                      | 4. 8            | 1. 8                    |
| 文献値           | 2. 19                     | 4. 8            | 1. 8                    |

上段に本発明による実測値、下段に他の研究者がかかって測定した文献値が示されている。この表1から明らかなように、上段と下段の2つの値は非常によく一致しており、本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムは、間違いなく蛍光寿命を計測することができる。

第5図は本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムによる蛍光寿命の測定例を示す図である。

この図において、横軸は時間(n s)、縦軸は蛍光強度(a. u: 相対単位)を示しており、■はフルオレセイン、◆はスルフォローダミン、●YG蛍光ビーズの蛍光減衰曲線を示している。

なお、本発明は上記実施例に限定されるものではなく、本発明の趣旨に基づいて種々の変形が可能であり、それらを本発明の範囲から排除するものではない。

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、以下のような効果を奏することができる。

(1) 生体等深部の断層像の取得と蛍光寿命分布の可視化を同時に容易に実現することができる。

よって、蛍光スペクトラム変化の無い分子の測定でも蛍光比画像を取得でき、観察の障害となる色素濃度変動や励起光強度の変動等の要因を排除できる。

従って、生体深部での生理活性物質の分布、活性を高精度で測定することができる。

(2) 特に、生体サンプル中でドラッグスクリーニングや光記憶媒体の読み出し検査等、医学から産業まで広い分野での利用が期待される。

#### 産業上の利用可能性

本発明の多光子励起蛍光寿命画像化システムは、

(1) 生体深部での生理活性物質の分布、活性を高精度で測定できるので、医学・生理学用レーザー顕微鏡に用いられ、生体試料検体のドラッグスクリーニング装置に応用される。

(2) 患者・被検者の皮膚や器官表皮など外皮、内皮下深部の蛍光画像を用いた臨床的な検査装置に応用される。

(3) 高い深部方向の分解能から、半導体、光記憶媒体の書き込み、読み出し、検査装置など、医学から産業までの広い分野への適用が可能である。

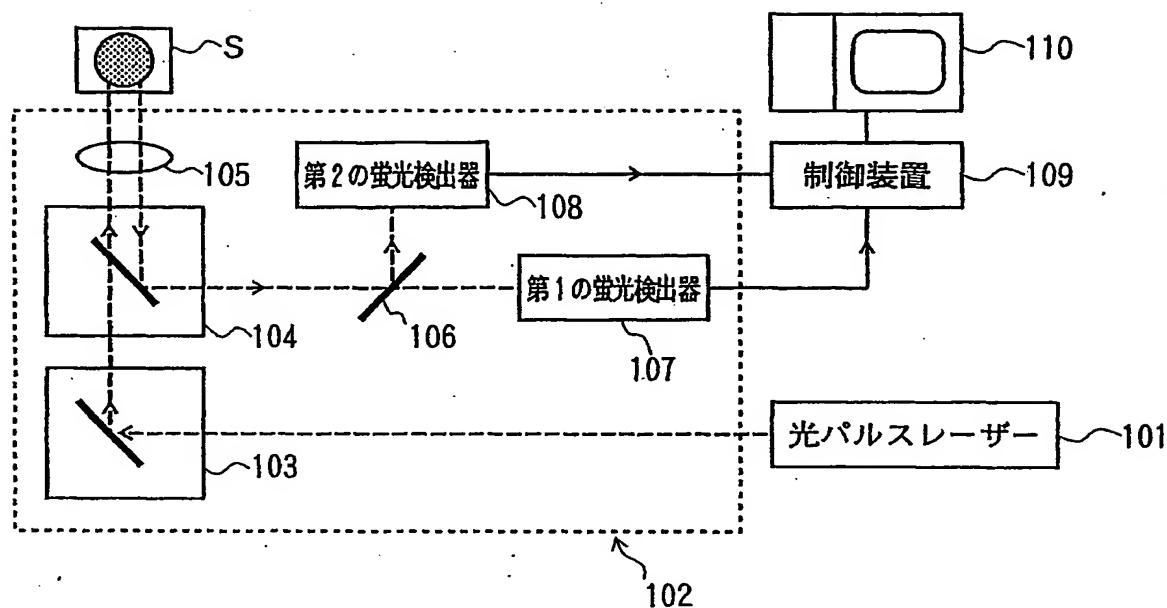
## 請求の範囲

1.

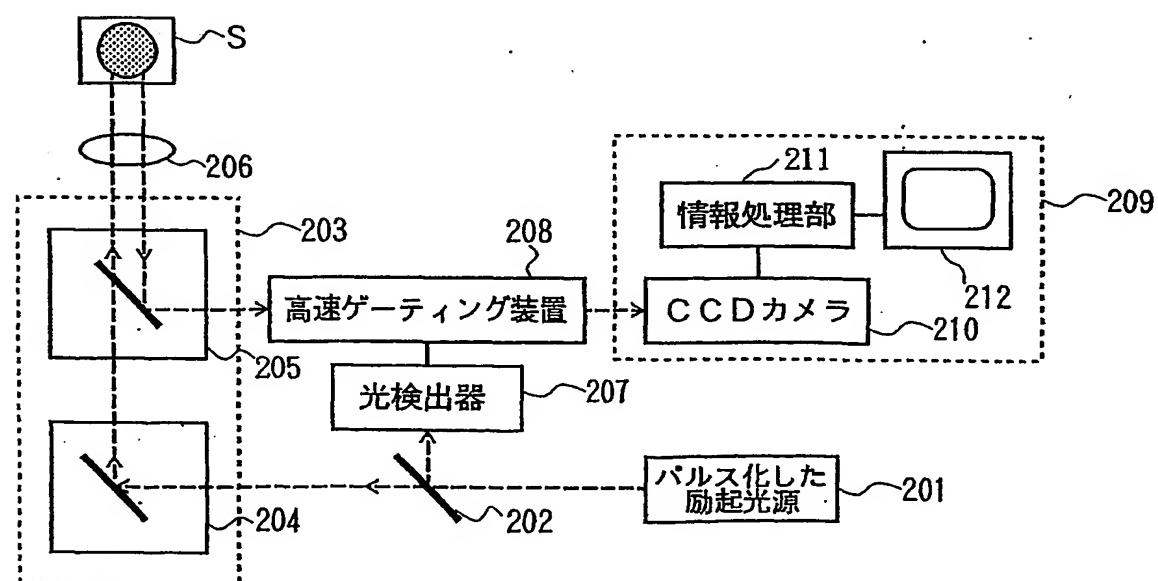
- (a) 超短光パルスレーザー発生装置と、
- (b) レーザースキャン型蛍光顕微鏡と、
- (c) 該レーザースキャン型蛍光顕微鏡の蛍光検出器の前に配置される高速ゲーティング装置とを備え、
- (d) 前記超短光パルスレーザー発生装置からの励起用光パルスと同期して前記高速ゲーティング装置の超高速シャッターを切るようにし、蛍光を時間分解を行ってから前記蛍光検出器に導入するようにしたことを特徴とする多光子励起蛍光寿命画像化システム。

2. 請求項1記載の多光子励起蛍光寿命画像化システムにおいて、前記超短光パルスはピコ乃至フェムト秒パルスであることを特徴とする多光子励起蛍光寿命画像化システム。

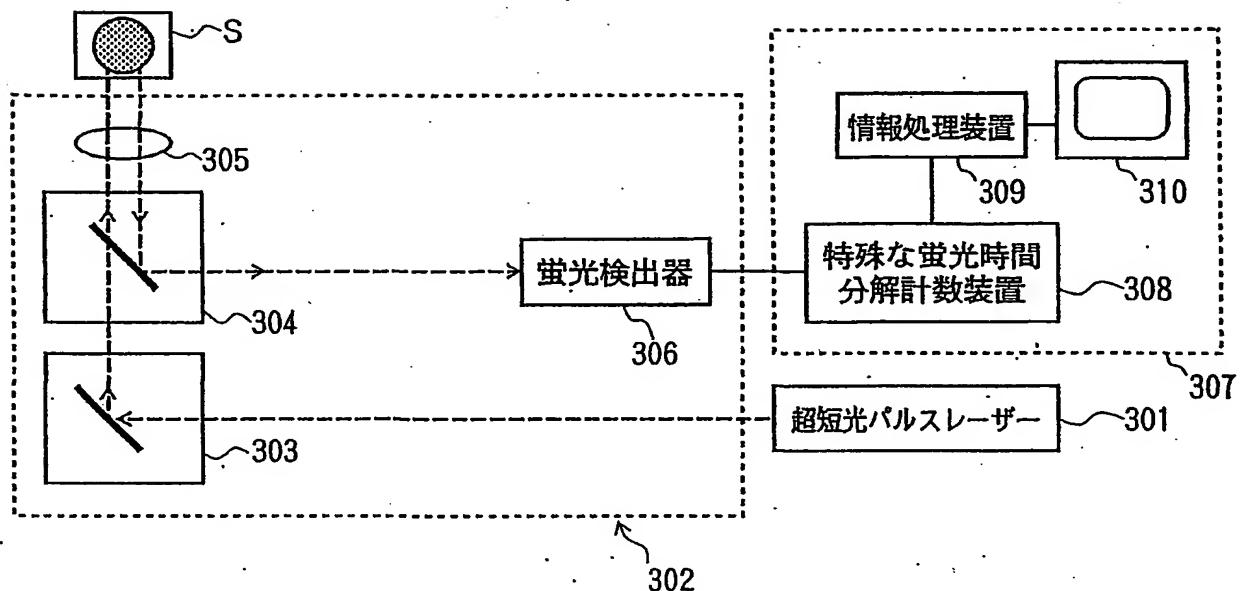
第 1 図



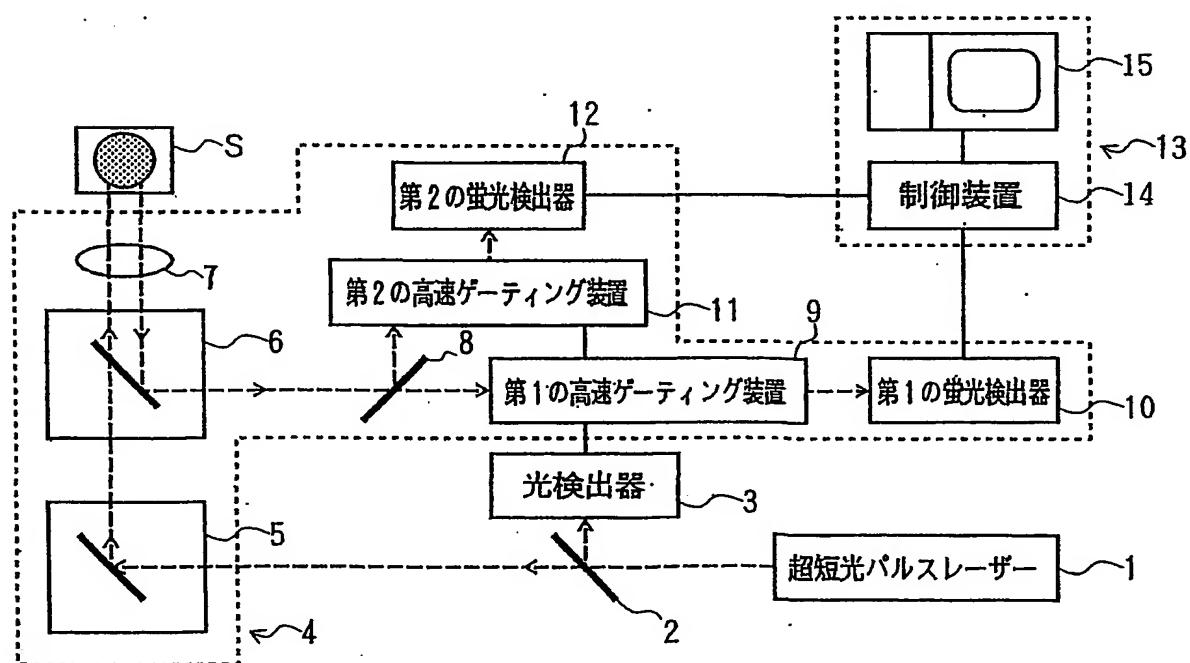
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

